

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GEOGRAFIA  
CURSO DE GESTÃO EM SAÚDE AMBIENTAL

Ação de novos complexos de rutênio (II): efeitos citotóxicos em *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Thalissa Soares Nery

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Coordenação do Curso  
de Gestão em Saúde Ambiental, da  
Universidade Federal de Uberlândia,  
para a obtenção do grau de Bacharel  
em Gestão em Saúde Ambiental.

Uberlândia-MG

Julho-2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GEOGRAFIA  
CURSO DE GESTÃO EM SAÚDE AMBIENTAL

Ação de novos complexos de rutênio (II): efeitos citotóxicos em *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Thalissa Soares Nery

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tadini

Co-orientador: M.<sup>a</sup> Mônica Soares Costa

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Coordenação do Curso  
de Gestão em Saúde Ambiental, da  
Universidade Federal de Uberlândia,  
para a obtenção do grau de Bacharel  
em Gestão em Saúde Ambiental.

Uberlândia-MG

Julho-2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GEOGRAFIA  
CURSO DE GESTÃO EM SAÚDE AMBIENTAL

Ação de novos complexos de rutênio (II): efeitos citotóxicos em *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Thalissa Soares Nery

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tudini

Co-orientador: M.<sup>a</sup> Mônica Soares Costa

Unidade Acadêmica: Instituto de Biotecnologia

Homologado pela Coordenação do Curso de Gestão em Saúde Ambiental em  
12 / 07 / 2019.

Coordenador do Curso: Prof. Dr. Jean Ezequiel Limongi

Uberlândia – MG

Julho-2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GEOGRAFIA  
CURSO DE GESTÃO EM SAÚDE AMBIENTAL

Ação de novos complexos de rutênio (II): efeitos citotóxicos em *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Thalissa Soares Nery

Aprovado pela Banca Examinadora em \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_.

Nota: \_\_\_\_\_

Nome e assinatura do presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, 12 de Julho de 2019.

Dedico esta conquista a minha família pelo apoio contínuo e amor incondicional. Sem vocês eu nada seria.

## Resumo

Considerada uma zoonose adquirida em áreas tropicais, a Leishmaniose acomete em média 1,3 milhões de indivíduos ao ano, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS). Portanto, a doença recebe o título de endêmica em nível mundial pelo caráter negligenciado da doença. Ainda, o número de casos tende a sofrer ascensão, sendo que para o momento, já atinge 98 países. O parasito atua de forma intracelular, impactando o corpo de modo a causar danos físicos, psicológicos e, caso a enfermidade não seja tratada, há riscos de o paciente vir a óbito. Nesse sentido, um dos problemas encontrados são os medicamentos atualmente disponíveis para o tratamento da doença, que apresentam custo elevado, resistência por parte do parasito e efeitos adversos ao paciente. Assim, surge no âmbito da terapêutica os complexos de rutênio (II) com potencial uso para o tratamento da doença. Neste trabalho, os efeitos citotóxicos de 3 novos complexos de rutênio (II), denominados E2, E3 e E4, bem como a molécula precursora (E) para a síntese desses novos complexos, foram analisados em formas promastigota de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, por meio do ensaio de MTT. Os resultados mostraram que todos os 3 novos complexos apresentaram potencial citotóxico contra os parasitos.

Palavras-chave: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, Complexos de Rutênio (II), Citotoxicidade.

## Abstract

Considered a zoonosis acquired in tropical areas, Leishmaniasis affects an average of 1.3 million individuals per year, according to the World Health Organization (WHO). Therefore, the disease is endemic in the world because of the neglected nature of the disease. Still, the number of cases tends to increase, and for the moment, it reaches 98 countries. The parasite acts intracellularly, impacting the body in a way that causes physical and psychological damage and, if the disease is not treated, there is a risk that the patient will die. In this sense, one of the problems encountered is the drugs currently available for the treatment of the disease, which present high cost, resistance by the parasite and adverse effects to the patient. Thus, ruthenium complexes (II) with potential use for the treatment of the disease appear within the scope of the therapy. In this work, the cytotoxic effects of 3 new ruthenium (II) complexes, called E2, E3 and E4, as well as the precursor molecule (E) for the synthesis of these new complexes, were analyzed in promastigote forms of *Leishmania (Viannia) braziliensis*, by means of the MTT assay. The results showed that all 3 new complexes presented cytotoxic potential against the parasites.

**Key words:** *Leishmania (Viannia) braziliensis*, Complexes of Ruthenium (II), Cytotoxicity.

## **Sumário**

<b>1. Introdução</b>	1
<b>2. Referencial Teórico</b>	4
2.1 Leishmanioses	4
2.2- Epidemiologia da leishmaniose	8
2.3- Ciclo de Vida	11
2.4. Tipos de Tratamento da leishmaniose	13
2.5. Rutênio	15
<b>3. Objetivo</b>	16
3.1. Objetivos específicos	16
<b>4. Metodologia</b>	16
4.1. Obtenção e preparo dos complexos de rutênio (II)	17
4.2. Cultura de parasitos	18
4.3. Preparo e contagem de parasitos para o ensaio de citotoxicidade	18
4.4. Ensaio de Citotoxicidade por MTT	18
4.5 Determinação de citotoxicidade e cálculo do IC <sub>50</sub>	21
4.6. Análise Estatística	21
<b>5. Resultados</b>	21
<b>6. Discussão</b>	23
<b>7. Conclusão</b>	25
<b>8. Referencial Bibliográfico</b>	25





## 1. Introdução

A leishmaniose é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por protozoários parasitas do gênero *Leishmania* (ROSS, 1903), que pertence à ordem Kinetoplastida, à família Trypanosomatidae (HIDE et al., 2007) e tem sua transmissão dada através do repasto sanguíneo realizado pelas fêmeas de flebotomíneos infectadas com o parasito, sendo que 21 espécies de *leishmania* causam doença no homem (HIDE et al., 2006; ROBERTS, 2006; BARI et al., 2008; OMS, 2014). No Brasil, a principal espécie de flebotomíneo responsável pela transmissão da doença é a *Lutzomyia longipalpis* (GUERRERO et al., 2017). A doença pode ser dividida de acordo com sua forma clínica, em: Leishmaniose Tegumentar (LT) e Leishmaniose Visceral (LV).

A (LT) é a manifestação clínica na qual é observado o desenvolvimento de lesões na pele (cutânea), ou da mucosa (mucocutânea), causando ao indivíduo problemas como úlceras, mutilação parcial ou total da mucosa naso-faríngea. Ressalta-se que o paciente em todos os estágios da doença, sofre grandes danos psicológicos e caso aconteça a mutilação esse trauma perdura. As principais espécies causadoras de LT no Brasil são: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) shawi* e *Leishmania (Viannia) naiffi* (BRASIL, 2017).

A forma mais delicada e grave da doença é a LV ocasionada pelas espécies *Leishmania (Leishmania) donovani*, *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Leishmania) infantum*, *Leishmania (Leishmania) enriettii*, *Leishmania (Leishmania) hertigi*. A doença afeta órgãos vitais como o baço, rins, linfonodos e fígado ocasionando a presença e disseminação de grande carga parasitária nessas estruturas (BRASIL, 2017).

Na fase crônica da doença, observa-se a hepatoesplenomegalia, caracterizada pela inflamação do fígado e baço, pois esta forma clínica provoca intensa atividade imunológica do organismo como forma de resposta ao estado de infecção. Convém ressaltar que, em caso de falta de tratamento adequado o indivíduo pode vir a óbito. As principais espécies causadoras da LV no Brasil são: *Leishmania (Leishmania) infantum* e *Leishmania (Leishmania) donovani* (ALVAR et al., 2012; BRELAZ et al., 2012; VIEIRA et al., 2013; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

Além disso, a leishmaniose pode estar associada a outras formas de infecções, gerando assim, as coinfeções, como por exemplo o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV). Esta coinfeção é emergente em várias regiões do mundo, especialmente no sudoeste da Europa, no sul da Ásia, na África Subsaariana e na América do Sul, nos quais desde a década de 1990 há uma expansão em relação a essas coinfeções. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 2% a 9% dos pacientes com HIV no sudeste da Europa desenvolverão também a LV (BRASIL, 2011).

Respostas imunológicas diferentes, as quais geram as diversas formas clínicas da doença, são fruto da diversidade entre espécies infectantes, e dos fatores extrínsecos, como os determinantes socioambientais, que associados com fatores genéticos e de infecção determinam a forma de manifestação clínica no hospedeiro (VARGAS et al., 2001).

Infelizmente, a doença ainda acomete grande parcela da população mundial sendo evidenciada principalmente, em regiões subdesenvolvidas e em desenvolvimento. Nestes locais fatores como a baixa educação ambiental, condições sanitárias e insalubridade de moradias, ocasionam o aparecimento do vetor, já que, por vezes essas moradias são encontradas nas proximidades de locais favoráveis ao aparecimento e desenvolvimento do vetor. Outras fontes de surtos epidêmicos estão associadas a fatores decorrentes do surgimento de atividades com fins econômicos que impactam o meio ambiente, como por exemplo extrativismo, garimpos, produções agrícolas, dentre outras (BRASIL, 2009).

De acordo com a OMS estima-se que mais de 98 países são endêmicos para as Leishmanioses e que ao ano ocorra cerca de 1,3 milhões de novos casos (ALVAR et al., 2012; OMS, 2015). A doença é considerada negligenciada por vários aspectos, sobretudo devido à falta de investimentos em tratamentos mais seguros e eficazes (NAGLE, 2014).

Hoje se considera que, na América Latina, que a LT apresenta dois padrões epidemiológicos: surtos epidêmicos associados à derrubada de florestas em regiões pioneiras, que constitui o padrão clássico da enfermidade, e a transmissão em regiões de colonização antiga, associada às formas de ocupação do espaço, particularmente do espaço rural, embora também possa ocorrer em áreas urbanas (NEGRÃO; FERREIRA, 2014).

Assim, nota-se a instituição de um preocupante problema de saúde pública causado pelas políticas fundamentadas em ausência de um planejamento adequado para

as cidades, em que muitas vezes permite o avanço das moradias para regiões de campo e o consequente contato da população com o vetor. Outros elementos básicos de saúde como o saneamento e a educação são elementos fundamentais de acordo com o princípio dos direitos sociais da Constituição Federal de 1988 para que essas enfermidades não acometam os indivíduos (BRASIL, 1988).

Ressalta-se assim, que indivíduos infectados pelo parasito se tornam reservatórios da doença e atualmente, os métodos de tratamento ainda não são totalmente eficazes aos pacientes, provocando efeitos colaterais graves e casos de resistência parasitária. Aliado a isto, o custo benefício das atuais abordagens terapêuticas gera um elevado gasto de recursos públicos com medidas curativista.

Atualmente a forma de tratamento para todas as manifestações clínicas é administração intravenosa de antimoniais pentavalentes ( $Sb^{5+}$ ) na forma de estibogluconato de sódio (SSG) ou antimoniato de meglumina (Glucantime) (SANTOS et al., 2008). E como tratamento secundário tem-se a pentamidina, anfotericina B e paromomicina (BRASIL, 2017).

Entretanto, esses medicamentos ainda são falhos na efetiva erradicação da doença devido a uma série de limitações que incluem: alto custo, elevada toxicidade, administração parenteral por período prolongado, indução de efeitos adversos que resultam em baixa adesão ou abandono do tratamento pelos pacientes e, consequentemente, comprometem a eficácia do tratamento (MESQUITA, 2013; SILVA, et al, 2015).

Portanto, é evidente a necessidade do investimento em novas estratégias de tratamento, priorizando uma terapêutica que amenize os efeitos adversos que podem ser decorrentes da doença e permitindo a diminuição da resistência parasitária. Desta maneira, na esfera da Química Bioinorgânica destaca-se o rutênio, um elemento de baixa toxicidade ao corpo humano devido à capacidade de imitar a ligação do ferro com biomoléculas. (ALLARDYCE, 2001).

Os resultados obtidos com o desenvolvimento dessa pesquisa mostraram o potencial citotóxico de novos complexos de rutênio (II) sobre *leishmania* e apesar de os resultados serem preliminares são a base para a posterior realização de experimentos terapêuticos voltados ao tratamento da leishmaniose e assim trará benefícios aos indivíduos acometidos pela doença, que como supracitado sofrem perniciosidades

advindas da mesma. A busca por novas drogas é uma forma de repensar e evoluir os estudos para tal moléstia que afeta principalmente, populações marginalizadas, de baixa renda e pouca influência política, as quais infelizmente, contam com pouco investimento e assistência precária.

## 2. Referencial Teórico

### 2.1 Leishmanioses

Os parasitos do gênero *Leishmania*, são transmitidos por fêmeas infectadas de flebotomíneos (da ordem Diptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae) (YOUNG; DUNCAN, 1994) podendo provocar a forma tegumentar (LT) ou a forma visceral da leishmaniose (LV), de acordo com a espécie de parasito envolvido na infecção (OMS, 2014). A infecção é denominada de leishmaniose e ocorre, principalmente, em regiões de clima mais quente do Velho Mundo (Europa, África e Ásia) e do Novo Mundo (América) (COX, 1993).

A Leishmaniose Tegumentar (LT), é considerada uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, como por exemplo, a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, possui como manifestações clínicas a presença de lesões na pele e mucosas. A doença é uma infecção antroponozoonótica, possibilitando a infecção primariamente de outros animais, mas também pode acometer o homem (hospedeiro acidental) (BRASIL, 2017).

A LT é uma doença que acompanha o homem desde a antiguidade, existindo relatos na literatura desde o séc. I d.C. (LAISON, 1997). Nas Américas, foi descrita em cerâmicas pré-colombianas no Peru, datadas de 400 a 900 anos d.C., que apresentavam mutilações de lábios e narizes, características da espúndia, hoje conhecida como leishmaniose cutânea-mucosa (LAISON, 2010).

Posteriormente, a primeira referência de LT no Brasil encontra-se no documento da Pastoral Religiosa Político-Geográfica de 1827, presente no livro intitulado “Antigüedad de la Syphilis en el Peru”, onde se relata a viagem de Frei Dom Hipólito Sanches de Fayas y Quiros de Tabatinga (AM). Em sua viagem ele percorreu regiões do vale do rio Amazonas onde encontrou indivíduos com úlceras nos braços e pernas, além

de lesões destrutivas na boca e nariz, registrando a possível relação com a picada de insetos (FURTADO; DO VALE, 2005; FURUSAWA; BORGES, 2014).

Em 1885, na Índia foi relatado por Cunningham parasitos do gênero *Leishmania* que transmitiam leishmaniose visceral, a doença recebeu o nome de botão de Biskra. Paralelamente, no Brasil, foi identificado por Cerqueira, a mesma moléstia ocasionada pelo parasito da *Leishmania*. Entretanto, somente em 1909, Lindenberg, encontrou formas de *Leishmania*, idênticas à *Leishmania tropica* (WRIGHT, 1903) da leishmaniose do Velho Mundo, em lesões na pele de indivíduos que trabalhavam nas matas do interior do Estado de São Paulo.

Por considerar o parasito diferente da *L. tropica*, Gaspar Vianna, um médico brasileiro, conseguiu identificar formas morfológicas dispare e a batizou de, *L. (V.) braziliensis* (VIANNA, 1911), o agente etiológico da “úlcer de Bauru”, “ferida brava” ou “nariz de tapir” (SILVEIRA, 1997).

Com o aprimoramento de estudos ecológicos e epidemiológicos cerca de 53 espécies do parasito foram descritas em diferentes regiões do mundo, dessas, 31 espécies classificam-se como parasitos de mamíferos, e desse total 21 espécies são patogênicas para seres humanos (GRAMICCIA et al., 2005; HIDE et al., 2006).

Tendo em vista a variedade de manifestações clínicas associadas à LT em relação aos pacientes, novas definições foram elaboradas. É sabido que as manifestações clínicas são dependentes de fatores que estimulam a resposta imune positiva no corpo humano, como características do parasito, aspectos genéticos do hospedeiro e as condições ambientais em que o mesmo está inserido (BRELAZ et al., 2012; VIEIRA et al., 2013). Assim sendo, a LT pode ser subdividida em leishmaniose cutânea localizada (LCL) ou leishmaniose cutânea difusa (LCD e leishmaniose cutaneomucosa (LCM). A Tabela 1 apresenta as características das principais formas clínicas da LT no Brasil e ainda mostra a LV, forma da doença em que há comprometimento de órgãos, como fígado e baço (NEVES, 2011). Ressalta-se que o período de incubação da doença no ser humano é, em média, de dois a três meses, podendo variar de duas semanas a dois anos (BRASIL, 2017).

A LC normalmente possui lesões ulcerativas indolores que costumam localizar-se em áreas expostas da pele. O formato dessas lesões é arredondado, com bordas elevadas e bem delimitadas, com fundo granuloso e avermelhado. As lesões iniciais são pequenas denominadas de pápulas, e se parecem com à picada de insetos. Entretanto, com o passar

do tempo elas evoluem e sofrem aumento em tamanho e profundidade. Caso não tratadas, as lesões podem se curar espontânea no período de alguns meses a poucos anos, ou outra possibilidade é a permanência de sua atividade (NEVES, 2011; BRASIL, 2017).

Características Principais das Formas Clínicas da Leishmaniose no Brasil		
Formas Clínicas	Localização	Espécie de <i>Leishmania</i>
<b>Leishmaniose Cutânea</b>	Produce lesões na pele. Inicial no rosto, braços e pernas. Apesar de esta forma ser frequentemente auto-curativa, pode criar sérias incapacitações e cicatrizes permanentes. Após a recuperação por tratamento com sucesso, a leishmaniose cutânea induz à reinfeção às espécies de <i>Leishmania</i> que causam a doença. Representa 50 a 75% dos casos de leishmaniose.	<i>L. (L.) amazonensis</i> , <i>L. (V.) braziliensis</i> , <i>L. (V.) guyanensis</i> , <i>L. (V.) lainsoni</i>
<b>Leishmaniose Cutânea Difusa</b>	Tem difícil tratamento devido às lesões disseminadas que se assemelham à hanseníase e não tem cura espontânea. Esta forma em particular está relacionada a um sistema imune defeituoso, e é caracterizado por apresentar recaídas após o tratamento.	<i>L. (L.) amazonensis</i>
<b>Leishmaniose Cutaneomucosa</b>	Também conhecida como espúndia na América do Sul, causa lesões desfigurantes na face, destrói as membranas, mucosas do nariz, boca e garganta. A cirurgia reconstrutiva das deformidades é um importante passo da terapia.	<i>L. (V.) braziliensis</i> , <i>L. (V.) guyanensis</i>
<b>Leishmaniose Visceral</b>	Também é conhecida como calazar, é caracterizada por febres irregulares perda de peso, hipertrofia do fígado e baço, anemias. Está é a forma mais severa das leishmanioses, e frequentemente fatal se não tratada.	<i>L. (L.) infantum</i> , <i>L. (L.) donovani</i>

Tabela 1- Representação das formas clínicas de Leishmaniose. Adaptado de (OMS, 2004).

Quanto aos subtipos da LC, a LCL caracteriza-se pelo acometimento primário da pele, normalmente é representada por lesões ulceradas que se regeneram espontaneamente e respondem bem ao tratamento. Já a forma LCD é observada em pouquíssimos casos, cerca de 2% segundo o Ministério da Saúde, e, dessa forma, exige maior atenção por ser considerada grave e não ter respostas eficientes aos medicamentos usuais. A LCD é caracterizada pelo aparecimento de diversas lesões papulares pelo corpo, com maior incidência na face e as espécies envolvidas são a *Leishmania (V.) braziliensis* e a *Leishmania (L.) amazonensis* (BRASIL, 2017; OMS, 2004).

A LCM é caracterizada clinicamente pelo comprometimento de forma parcial ou total das mucosas das vias aéreas superiores como boca, nariz e garganta (NEVES, 2011; BRASIL, 2017). Acredita-se que a forma LCM seja decorrente de anterior presença de lesões compatíveis com a forma LC, as quais não tiveram tratamento adequado ou houve a ausência de tratamento, resultando na manifestação LCM, que consiste em uma forma mais grave da doença (BRASIL, 2017).

Portanto, comparativamente, observa-se que a LC é caracteriza-se pela presença de lesão ulcerada localizada única ou múltipla, com boa resposta ao tratamento. Por outro lado, a LCM caracteriza-se pela presença de infiltração da oro e nasofaringe com lesões vegetantes, ulceradas e destrutivas, tem caráter crônico e de difícil tratamento (GOTO; LINDOSO, 2010; BRASIL, 2010).

Por fim, a LV é descrita como uma doença que acomete o homem de forma que este apresente como e sua sintomatologia inclui a febre, esplenomegalia associada ou não a hepatomegalia. Na fase inicial da doença os períodos de febre duram em torno de 4 semanas, a palidez da pele e mucosas também é característica, bem como a esplenomegalia. Associado a esses fatores, geralmente os exames realizados revelam a presença da anemia, ocasionando o emagrecimento muito rápido e notável do paciente, além de outras manifestações como hemorragias (epistaxe, gengivorragia e petéquias), icterícia e ascite (BRASIL, 2009). Tais manifestações são decorrentes do acometimento de órgãos fundamentais para o homem como o baço, fígado, linfonodos e medula óssea.

A LV está presente em praticamente todo o mundo e é considerada pela OMS como uma das doenças mais perigosas transmitidas por vetores (Figura 2), pois essa forma apresenta uma alta taxa de mortalidade. As espécies responsáveis por essa forma clínica são *L. (L.) donovani*, encontrada principalmente na África e Índia e *L. (L.)*



*infantum*, encontrada na Europa, Norte da África e América Latina (MAURICIO; STOTHARD; MILES, 2000; LUKES et al., 2007).

A doença é de grande relevância na Saúde Pública, devido à sua ampla distribuição e, no caso da LT, a capacidade de produzir deformidades, promove reflexões no campo social e econômico (BRASIL, 2010), impactando fortemente no Sistema Único de Saúde (SUS) e aumentando os gastos com insumos e formas de tratamento para os enfermos.

## **2.2- Epidemiologia da leishmaniose**

De acordo com a OMS 1,3 milhões de novos casos da enfermidade ocorrem por ano, sendo 300 mil de formas viscerais (tendo 90% dos casos distribuídos entre os países Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão) e 1 milhão de formas tegumentares (maioria no 17 Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Iran, Paquistão, Peru, Arábia Saudita, Síria e Tunísia). A LT está entre as seis doenças infecto-parasitárias mais prevalentes no mundo, sendo uma doença prioritária para controle pela OMS. A subforma mucosa da LT é predominante no Brasil, Peru e Bolívia (SAVOIA, 2015; OMS, 2015; OMS, 2010).

Nas últimas décadas, a distribuição de leishmaniose pelo mundo e consequente aumento de números de casos foi observado (Figuras 1 e 2). Essa condição é dada pela expansão de alguns fatores como: alterações climáticas promovidas por ações antrópicas, baixas condições socioeconômicas, que provocam em grande parte das vezes desnutrição; assim como as guerras, fluxo migratório, derrubada de florestas para urbanização e aumento de condições imunossupressoras como a coinfeção HIV (OMS, 2010).

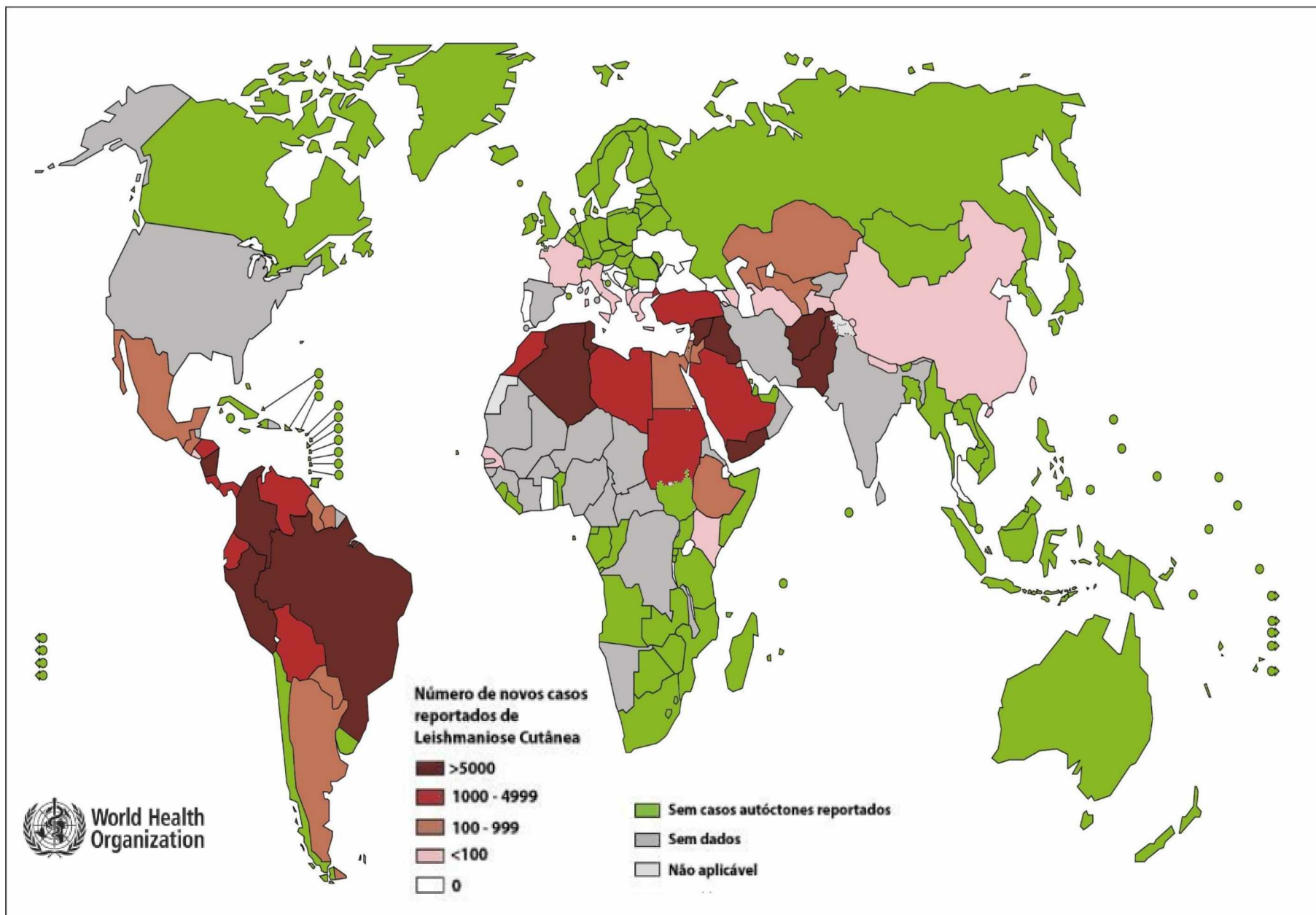


Figura 1- Status da endemicidade da Leishmaniose Cutânea pelo globo em 2015 (OMS, 2016).

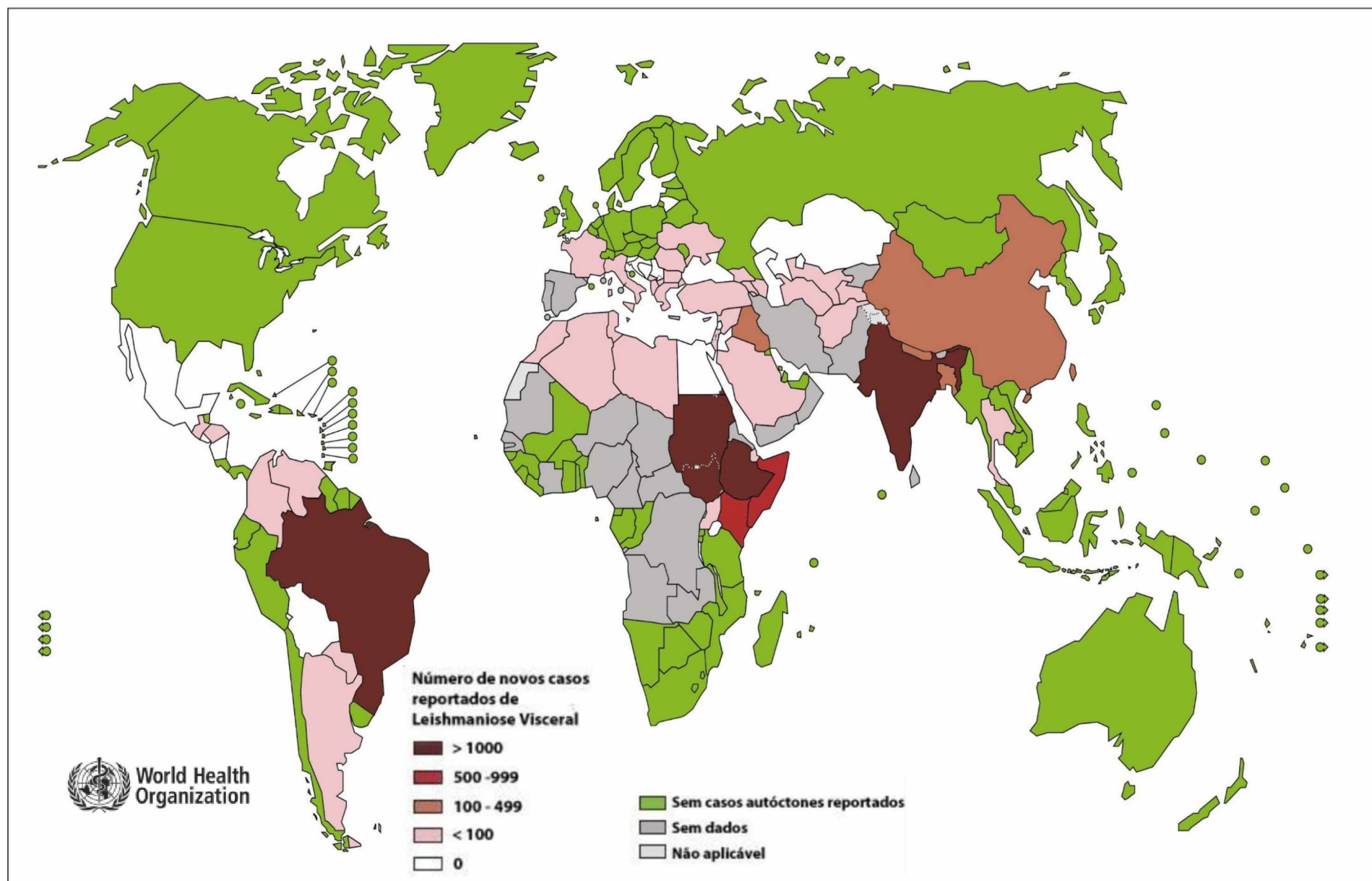


Figura 2- Status da endemicidade de Leishmaniose Visceral pelo globo em 2015 (OMS, 2016).

No Brasil, houve a mudança do perfil epidemiológico da doença, que inicialmente se restringia às regiões florestais e acometia populações que eventualmente adentravam nas matas. Entretanto atualmente, com a constante derrubada de florestas para expansão das cidades o vetor tornou-se cada vez mais próximo da população e se adaptou ao ambiente peri-domiciliar com facilidade. Assim, animais como cães e roedores passaram a atuar como reservatórios da doença (BRASIL, 2010).

### 2.3- Ciclo de Vida

Os protozoários do gênero *Leishmania* apresentam ciclo biológico heteroxênico, ou seja, alternam-se entre um hospedeiro invertebrado e um vertebrado. Os hospedeiros invertebrados incluem fêmeas de flebotomíneos hematófagos do gênero *Lutzomyia* dentre as quais se destaca a *Lutzomyia longipalpis* (FEITOSA et al., 2000) nas Américas, e *Phlebotomus*, na Europa, Ásia e África (ROBERTS; JANOVY, 2000). Já os hospedeiros vertebrados consistem em uma ampla variedade de mamíferos como marsupiais, roedores, edentados e canídeos que podem atuar como reservatórios, sendo o último a forma mais comum de ser encontrada principalmente, no Brasil. O homem é um hospedeiro acidental e não tem papel importante na manutenção dos parasitos na natureza (BRASIL, 2007).

O parasito passa por estágios morfológicos distintos no seu ciclo de vida, apresentando duas formas principais: promastigota extracelular e amastigota intracelular. As formas promastigota, são encontradas no trato digestivo do hospedeiro invertebrado e possuem características como o flagelo, que emerge do corpo do parasito, o núcleo é arredondado ou oval e se situa próximo ao centro do corpo do parasito. No trato digestivo dos flebotomíneos a forma flagelada ou promastigota tem cerca de 16-40 por 1,5-3 micrômetros. (AKHOUNDI et al., 2016; SHAW, 1994). Essa forma parasitária apresenta um cinetoplasto situado entre a extremidade anterior e o núcleo, próximo à bolsa flagelar.

A forma amastigota, presente no interior das células fagocitárias de mamíferos (LASKAY et al., 2008), possui características como um núcleo grande e arredondado, ocupando parte considerável da célula do parasito, além de um cinetoplasto em forma de bastonete (KAMHAWI, 2006; BATES, 2008). Nos hospedeiros mamíferos a forma amastigota tem entre 1,5-3 por 3-5,5 micrômetros, é imóvel, e se multiplica

obrigatoriamente dentro de células do sistema monocítico fagocitário (AKHOUNDI et al., 2016; SHAW, 1994).

O ciclo inicia-se com o repasto sanguíneo do inseto vetor no hospedeiro vertebrado parasitado, onde o inseto vetor adquire a linfa e sangue contendo células do sistema mononuclear fagocítico parasitadas (HANDMAN; BULLEN, 2002). Dessa forma, o parasito, no hospedeiro invertebrado, diferencia-se em promastigota e consegue se desenvolver no interior do tubo digestório do inseto como forma promastigota procíclica, altamente replicativas mas pouco infectivos, posteriormente tais formas migram em direção à porção anterior do intestino do mosquito (intestino grosso para espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia* e intestino delgado para espécies do subgênero *Leishmania*). E em seguida, vão para o probóscide do inseto vetor (BATES, 2004; COX, 1993).

Neste local, a forma promastigota procíclica passa por modificações em sua estrutura até se diferenciar completamente em promastigota metacíclico, uma forma altamente infectiva para o hospedeiro vertebrado. Porém, o seu flagelo apresenta quase o dobro do seu tamanho, conferindo ao parasito uma melhor mobilidade. O inseto sofre uma grande irritabilidade em relação à presença de protozoários em sua mucosa bucal. Quando o inseto vetor parasitado realiza novo repasto sanguíneo, ele inocula as formas promastigota metacíclica em novo hospedeiro vertebrado (BATES; ROGERS, 2004), fazendo com que ocorra o ciclo heteroxênico (Figura 3).

Ao adentrar no corpo de hospedeiros vertebrados, os parasitos em geral são capturados por células do sistema fagocítico mononuclear como monócitos, macrófagos, dentre outras (LASKAY et al., 2008). Entretanto, a funcionalidade dessas células é perdida, pois elas não conseguem destruir os parasitos que as infectam devido a ação quimiotática da saliva dos vetores. Assim sendo, os parasitos conseguem se diferenciar da forma promastigota para amastigota e se reproduzir por divisão binária, dentro dos vacúolos dos macrófagos. Com isso, a células fagocítica ficará desprovida de mecanismos defesa, pela alta quantidade de parasitos e então sofrerá lise. O rompimento dessas células ocasionará a consequente liberação de formas amastigota, as quais infectarão novas células, estendendo a infecção para outras células saudáveis do hospedeiro vertebrado.

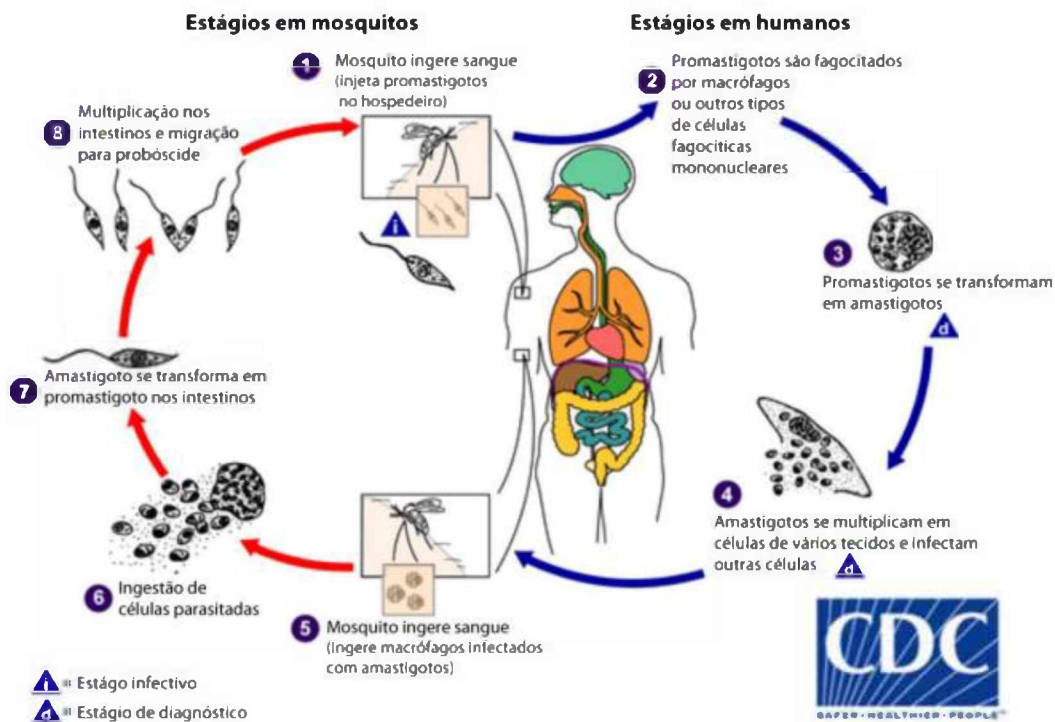


Figura 3- Ciclo de vida da *Leishmania*. Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Adaptado para português. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/bvology.html>.

## 2.4. Tipos de Tratamento da leishmaniose

Atualmente, o tratamento possui opções de drogas de primeira e segunda escolha. A determinação da droga a ser utilizada depende do estado de saúde que o paciente se encontra, da forma clínica da doença, do fármaco e da presença ou ausência de doenças associadas. Além disso, a espécie de parasito também interfere na resposta dada por cada organismo.

As drogas de primeira escolha utilizadas são os antimoniais pentavalentes ( $Sb^{5+}$ ). Os antimoniais podem ser utilizados sob duas formas: estibogluconato de sódio (SSG) ou antimoniato de meglumina (Glucantime) (SANTOS et al., 2008). Os  $Sb^{5+}$  apresentam diversos efeitos colaterais, sendo observado: artralgia, mialgia, náusea, vômito, sensação de plenitude gástrica, dor abdominal, prurido, febre, astenia, cefaleia, tontura, insônia, edema. Esta medicação também atravessa a barreira transplacentária, é eliminada em pequenas quantidades no leite materno e pode impregnar o tecido nervoso fetal. Seu uso é contraindicado em gestantes, cardiopatas, nefropatas ou hepatopatas. (LIMA et al., 2007; BRASIL, 2007; OLIVEIRA et al., 2011). No Brasil o Sistema Único de Saúde

(SUS) fornece esse medicamento, que deve ser aplicado diariamente durante um período de no máximo vinte dias e no mínimo quarenta dias via intramuscular ou intravenosa (MARCONATO, 2007).

Caso a droga de primeira escolha ocasione uma resposta terapêutica insatisfatória na impossibilidade do seu uso em caso de resistência do parasita ou de intolerância ao medicamento é necessário a existência de outra droga para dar continuidade ao processo de tratamento. Existem remédios de segunda escolha tais: Anfotericina B, Aminosidina, Pentamidina e Imunoterapias com Interferon (MARCONATO, 2007). Destacam-se, portanto, a anfotericina B e as pentamidinas (sulfato de pentamidina e mesilato de pentamidina) (LIMA et al., 2007; BRASIL, 2007; SUNDAR, CHAKRAVARTY, 2015).

A anfotericina B é considerada a droga de primeira escolha no tratamento de gestantes. É contraindicada em pacientes cardiopatas, hepatopatas e nefropatas, pois alguns efeitos adversos podem acometer os pacientes, a saber: anafilaxia, trombocitopenia, dor generalizada, convulsões, calafrios, febre, flebite, anemia, anorexia, diminuição da função tubular renal e hipocalcemia dos doentes. A anfotericina B também pode ser encontrado na forma lipossoma. Assim a droga apresenta maior tolerância dos pacientes devido à menor quantidade de efeitos colaterais. Porém, a limitação para o seu emprego em grande escala é o seu custo elevado e necessidade de infusão venosa (LIMA et al., 2007; BRASIL, 2007; OMS, 2010).

A pentamidina, outra droga secundária de grande importância vem sendo amplamente utilizada na região Norte do país, pela vantagem do custo geral em relação aos SB<sup>5+</sup>, além do menor tempo de administração do fármaco ao paciente (AMATO et al., 2007; BRASIL, 2007; NEVES et al., 2011).

Como visto, os tratamentos disponíveis possuem sérias limitações relacionadas a efeitos colaterais graves, resistência dos parasitos, estabilidade do medicamento, segurança a saúde do paciente e alto custo de produção, dificultando a administração desses fármacos em países mais pobres. Sendo assim, os regimes de tratamento disponíveis apresentam significativas falhas terapêuticas e são muito tóxicos. A ocorrência de recaídas e relatos de resistência medicamentosa de abandono do tratamento são cada vez mais frequentes (COPELAND; ARONSON, 2015).

Nesse sentido, a crescente resistência do parasita aos medicamentos sugere que as terapias utilizadas atualmente precisam ser reconsideradas, e novas sejam descobertas

para que aconteça a redução das chances de efeitos colaterais tóxicos e de custos, além da diminuição do surgimento de resistência (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015).

## 2.5. Rutênio

No âmbito da terapêutica, a Química Bioinorgânica ou Bioquímica Inorgânica, surge como uma importante área de estudo para a descoberta de novos fármacos. A Química Bioinorgânica teve seu marco na década de 60 por meio dos estudos de Rosenberg e colaboradores, os quais descreveram as propriedades antitumorais exibidas pela cisplatina, um complexo de Platina (III) (ROSENBERG; VANCAMP; KRIGAS, 1965).

A cisplatina representou um marco histórico por ter propriedades que possibilitaram o uso no tratamento de câncer, além de diferentes tumores (ROSENBERG et al, 1965; WOZNIAK et al., 2004). Nesse sentido, com os efeitos dos complexos de cisplatina sendo positivos foi cada vez mais evidenciado por estudos a utilização de complexos metálicos para diferentes patologias (KOMEDA; CASINI, 2012; PEREIRA et al., 2015).

A partir disso, destaca-se o rutênio, um metal de transição, pouco abundante que geralmente é encontrado na natureza, e faz parte dos metais do grupo da platina (Rh, Pd, Os, Ir e Pt) (SILVA; GUERRA, 2012). Estudos destacam os complexos de rutênio na química bioinorgânica através de testes como os de citotoxicidade em células tumorais, as quais o complexo reflete positivamente nessa avaliação biológica e com isso, estão em fase de testes clínicos (ALESSIO et al., 2001; KOSTOVA, 2006; KOMEDA; CASINI, 2012). Além disso, a literatura aponta estudos que realizaram a avaliação citotóxica contra parasitos, vírus e bactérias (CLARKE, 2003; ANTONARAKIS, EMADI, 2010; MJOS, RVIG, 2014; MEDICI et al., 2015). Como por exemplo na malária, doença de chagas e leishmaniose (ALLARDYCE; DYSON, 2001; BARBOSA et al., 2014; MEDICI et al., 2015).

Os estudos envolvendo aplicação de complexos metálicos em doenças parasitárias teve início com os pesquisadores Williamson e Farrel (FARRELL, 1989; FARRELL; WILLIAMSON; MCLAREN, 1984). Este estudo analisou a atividade de complexos de platina relacionados as ações tripanossomicidas que possibilitou o desenvolvimento de novas pesquisas com o enfoque de aprimorar os complexos para que eles atuem



diretamente sobre as biomoléculas do parasito. Isso ocorre devido ao composto permitir mudanças na sua estrutura química e atacar diretamente o sítio alvo do parasito (NAVARRO et al., 2010; CABALLERO; SALAS; SANCHEZ-MORENO, 2015).

Trabalhos recentes têm mostrado o potencial de complexos de rutênio contra parasitos *Leishmania* (COSTA et al., 2017; COSTA et al., 2019). Costa e colaboradores (2017) mostraram a ação de novos complexos de rutênio (II) em diferentes espécies de *Leishmania* e ainda observação que os complexos interferem com o processo de infectividade do parasito (COSTA et al., 2017). Em 2019, o mesmo grupo mostrou as vias de morte envolvida no processo de citotoxicidade de tais complexos (COSTA et al., 2019).

### **3. Objetivo**

Com base nos dados até então expostos, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de 3 novos complexos de rutênio (II) e seu precursor sobre a viabilidade de formas promastigota de *Leishmania (Vianna) braziliensis*.

#### **3.1. Objetivos específicos**

Realizar testes por meio da análise de citotoxicidade dos complexos em relação às formas promastigotas. Tais complexos receberam a denominação de E2, E3 e E4. Todos os experimentos também foram analisados em relação a molécula precursora (E).

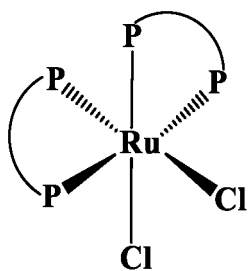
### **4. Metodologia**

Trata-se de uma pesquisa laboratorial desenvolvida com o apoio de infraestrutura do Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais (LABITOX). Classifica-se como quantitativo, já que, possibilita a mensuração de viabilidade e consequente interpretação dos resultados. Além de ser dependente de insumos laboratoriais, conta com equipamentos específicos para manutenção do parasito. Ressalta-se que em cada fase do procedimento é seguido um protocolo padrão.

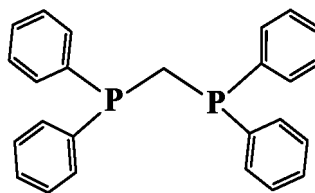
#### 4.1. Obtenção e preparo dos complexos de rutênio (II)

Os complexos de rutênio (II) utilizados neste trabalho foram sintetizados e gentilmente concedidos pelo Professor Dr. Gustavo Von Poelhsitz do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia. Os novos complexos foram sintetizados sob uma base precursora, denominada **E**, *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppm)<sub>2</sub>]; a qual deu origem a 3 novos complexos de rutênio, por meio de substituição simples do cloro (Cl) por 3 diferentes ligantes. Assim, os novos complexos foram denominados de **E2**, *cis*-[Ru<sup>II</sup>(TTA)(dppm)<sub>2</sub>][PF<sub>6</sub>]; **E3**, *cis*-[Ru<sup>II</sup>(TFBr)(dppm)<sub>2</sub>][PF<sub>6</sub>]; e **E4**, *cis*-[Ru<sup>II</sup>(TFF)(dppm)<sub>2</sub>][PF<sub>6</sub>] (Figura 4). O controle de todos os procedimentos de síntese, bem como de caracterização química dos complexos de rutênio (II) foram desenvolvidos sob responsabilidade do Professor Dr. Gustavo Von Poelhsitz.

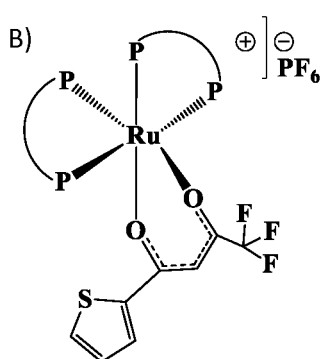
A)



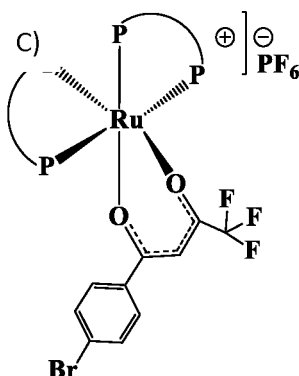
**Precursor E: *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppm)<sub>2</sub>]**



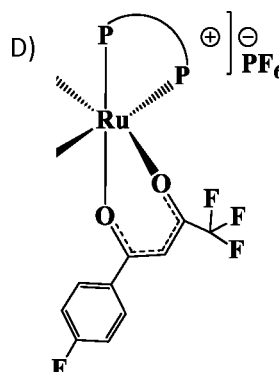
**P-P:dppm:1,1-bis-(difenilfosfina)metano**



**E2: *cis*-[Ru(TTA)(dppm)<sub>2</sub>][PF<sub>6</sub>]**



**E3: *cis*-[Ru(TFBr)(dppm)<sub>2</sub>][PF<sub>6</sub>]**



**E4: *cis*-[Ru(TFF)(dppm)<sub>2</sub>][PF<sub>6</sub>]**

Figura 4- Estrutura química de 3 novos complexos de Rutênio (II) utilizados neste trabalho. A figura mostra a estrutura da molécula precursora (**Precursor E**) utilizado como base para a síntese dos novos complexos. A parte inferior da figura exhibe os ligantes inseridos no precursor E por substituição simples do cloro (Cl), gerando assim, os novos complexos denominados **E2**, **E3** e **E4**.

#### 4.2. Cultura de parasitos

Formas promastigota de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (cepa MHOM/BR/75/M2904) foram cultivadas em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*), pH 7,4, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB); 1% de penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) e 2% de glicose – meio LIT completo - e mantidos em incubadora B.O.D à 23±0,5°C.

#### 4.3. Preparo e contagem de parasitos para o ensaio de citotoxicidade

Para a análise de citotoxicidade, formas promastigota cultivadas em meio LIT completo foram dispostas em um tubo Falcon de volume total de 15 mL, o qual foi submetido a um processo de centrifugação durante 7 minutos, não refrigerado, 2000 rotações por minuto (RPM) para a obtenção do precipitado. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspense em 1000µL de meio LIT completo para realizar a contagem de parasitos na suspensão. Na etapa seguinte, uma alíquota da suspensão de parasitos foi diluída em paraformaldeído 1% em tampão cacodilato de sódio e aguardou-se 10 minutos para a fixação dos parasitos. Após esse processo, 10µL da amostra fixada, em diluição adequada para contagem de células, foi disposta em câmara de Neubauer para a contagem visual da quantidade de parasitos em microscópio óptico (Nikon Eclipse 80i). Parasitos foram contados em quatro quadrantes. O número de parasitos obtidos foi dividido por 4 para obtenção quantidade média de parasitos por quadrante. Na sequência, foi utilizada a fórmula a seguir para a determinação da concentração de parasitos por mL.

$$\text{Concentração} = \text{Média do número de parasitos por quadrante} \times 10^4 (\text{fator de correção da câmara de Neubauer}) \times \text{Fator de diluição no preparo da amostra}$$

#### 4.4. Ensaio de Citotoxicidade por MTT

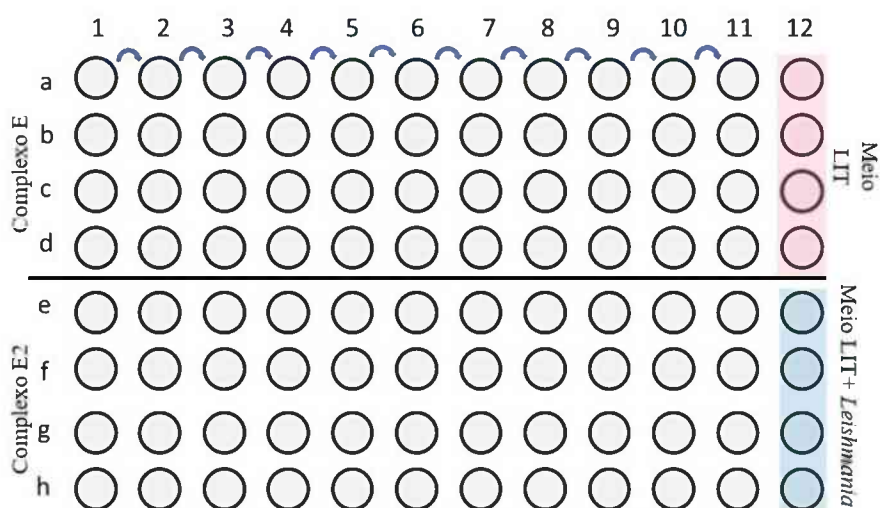
A técnica de MTT mede a viabilidade celular com base no dano induzido nas mitocôndrias. O princípio deste método é a avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais, quantificadas pela redução do MTT ( brometo de [3-(4,5- dimetiltiazol-

2yl) -2,5- difenil tetrazolium]) (um sal de coloração amarela solúvel em água) à formazan (cristais de coloração púrpura, insolúveis em água) (LI; SONG, 2007).

Para a realização do teste foram necessárias 2 placas com 96 poços para o experimento, conforme mostrado na (Figura 5). Cada amostra de complexo foi testada em quadruplicada para uma maior precisão, os valores de concentração da droga foram diminuindo conforme a pipetagem seriada, de maneira que o valor da concentração sofresse redução pela metade, ou seja, diluição dupla seriada.

Após essas definições, foi adicionado às placas meio de cultura contendo diferentes concentrações dos complexos de rutênio (E, E2, E3 e E4). Nos poços da coluna 1 de cada uma das linhas foi adicionado 100µL de cada complexo na concentração inicial de 200 µM. Nos poços das colunas 2 a 11 foram adicionados 50µL de meio LIT completo. Prosseguiu-se então com a diluição dupla- seriada. Assim, ao final do processo de diluição, os poços 1 a 11 passaram a conter 50µL de meio LIT completo contendo as concentrações de 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78; 0,39; 0,19 µM de cada complexo a ser testado. A coluna 12 das linhas de a – d continham somente meio LIT completo (100 µL), sendo, portanto, o branco do experimento. A coluna 12 das linhas e - h continham 50 µL de meio LIT completo sem complexo de rutênio e parasito caracterizando, portanto o controle de viabilidade celular do experimento.

Após o preparo das placas com meio de cultura contendo ou não complexo de rutênio, em cada poço foi adicionado 50 µL da suspensão de parasitos em cada poço das placas para obtenção de uma concentração final de  $5 \times 10^5$  parasitos/poço. Nos poços da coluna 12, linhas a-d não foram adicionados parasitos (branco do experimento).



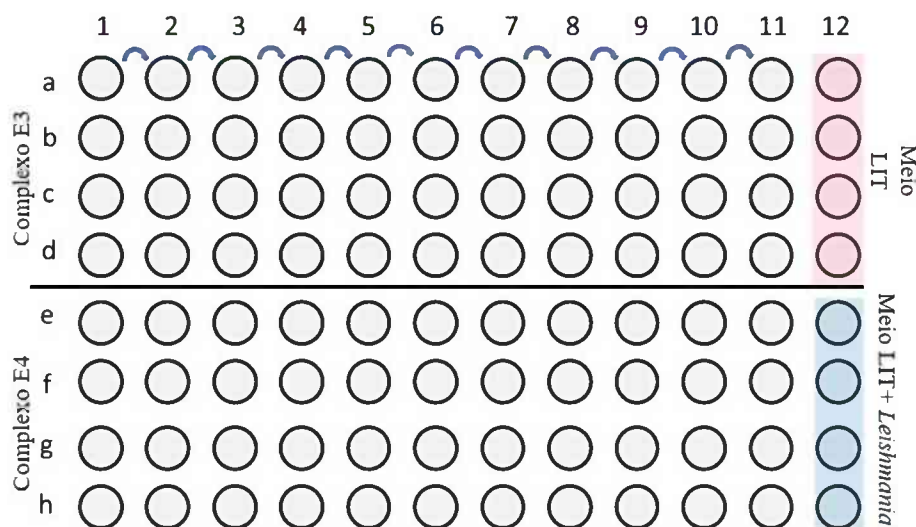


Figura 5- Layout das placas de 96 poços para a realização do ensaio de MTT. As setas azuis indicam a direção da diluição seriada para obtenção das diferentes concentrações. Em rosa, destacam-se os poços contendo apenas o meio de cultivo LIT completo (branco). Em azul, estão os poços contendo parasitos em meio LIT completo e sem complexo de rutênio (controle). Os complexos de rutênio (II) foram testados em quadruplicatas.

Após o preparo das placas os parasitos foram mantidos em incubadora de B.O.D (Demanda Bioquímica de Oxigênio) à  $23 \pm 0,5^\circ\text{C}$  por 72 horas. Após incubação, 20  $\mu\text{L}$  do reagente MTT (5mg/mL) foram adicionadas em cada poço da placa, as quais foram mantidas sob proteção da luz por 3 horas. Após esse tempo a reação foi parada por meio da adição de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) a 10% HCL 0,01 em PBS o qual também contribui para a solubilização dos cristais de formazan.

Após a adição de SDS as placas foram mantidas em repouso por 12 horas, sob proteção da luz em incubadora de 5% de  $\text{CO}_2$  e  $37^\circ\text{C}$ . Após este tempo as placas foram submetidas a leitura de absorbância em 570 nm na leitora de placas (Multiskan GO Thermo Scientific) que demonstra a quantidade de luz absorvida por determinado elemento. Os valores de absorbância obtidos foram analisados no software GraphPadPrism versão 6, para a determinação da citotoxicidade promovida pelos complexos de rutênio em relação aos parasitos controle.

#### 4.5 Determinação de citotoxicidade e cálculo do IC<sub>50</sub>

Após a obtenção dos dados pela leitura de placa, foi necessário realizar os cálculos de viabilidade celular, para consequente avaliação da citotoxicidade dos complexos de rutênio (II). Ressalta-se que a análise de viabilidade celular envolve a utilização de ferramentas que qualificam e/ou quantificam células “vivas”, ou seja, células metabolicamente ativas em uma cultura (ROGERO et al., 2000).

$$\% \text{ Viabilidade Celular} = \frac{(\text{Absorbância da amostra} - \bar{X} \text{ Controle Negativo})}{\bar{X} \text{ Controle Negativo} - \bar{X} \text{ Branco}} \times 100$$

$$\% \text{ Citotoxicidade} = 100 - (100\% \text{ Viabilidade Celular da amostra})$$

O parâmetro denominado IC<sub>50</sub> refere-se à medida quantitativa que indica quanto de uma substância é necessária para inibir um dado processo biológico em 50%. Neste experimento a análise foi realizada com o auxílio do programa “Graphpad Prism 6”. Para obtenção dos resultados foi necessário escolher regressão não-linear “Variable Slope”.

#### 4.6. Análise Estatística

Os dados de absorbância obtidos na leitura do ensaio MTT foram denotados como média ± desvio padrão de 2 experimentos em quadruplicada, os quais foram realizados de forma independente. Todos os dados foram primeiramente analisados para distribuição normal. As diferenças de significância foram determinadas pelo “one-way” ANOVA, utilizando o programa “GraphPad Prism 6” (GraphPad Software Inc, San Diego, USA). Os dados foram considerados estatisticamente significativos para  $p \leq 0,05$ .

### 5. Resultados

Os efeitos citotóxicos dos novos complexos de rutênio em formas promastigota de *Leishmania (V.) braziliensis* estão apresentados na Figura 6. Os dados mostram que todos os 3 novos complexos causaram efeito citotóxico nos parasitos e que tal efeito foi concentração-dependente.

A molécula precursora E não promoveu efeito citotóxico, uma vez que mesmo na maior concentração ensaiada (200  $\mu\text{M}$ ) a toxicidade celular foi inferior a 10%. Por outro lado, os novos complexos de rutênio, após substituições dos cloros por seus ligantes, exibiram toxicidade relevantes em concentrações a partir de 50  $\mu\text{M}$ .

O cálculo do  $\text{IC}_{50}$  mostrou valores muito próximos para os complexos E2, E3 e E4. Os valores de  $\text{IC}_{50}$  foram de 61,12  $\mu\text{M}$ , 56,2  $\mu\text{M}$  e 59,1  $\mu\text{M}$  para os complexos E2, E3 e E4, respectivamente (Tabela 2). Como esperado, os dados obtidos com o precursor E não possibilitaram o cálculo do  $\text{IC}_{50}$ , devido à ausência de toxicidade. Embora os valores de  $\text{IC}_{50}$  tenham sido muito próximos, podemos inferir que o complexo E3 exibiu uma melhor eficácia em relação aos demais complexos.

### Curvas de dose-efeito dos complexos de rutênio (II) em *L. (V.) braziliensis*

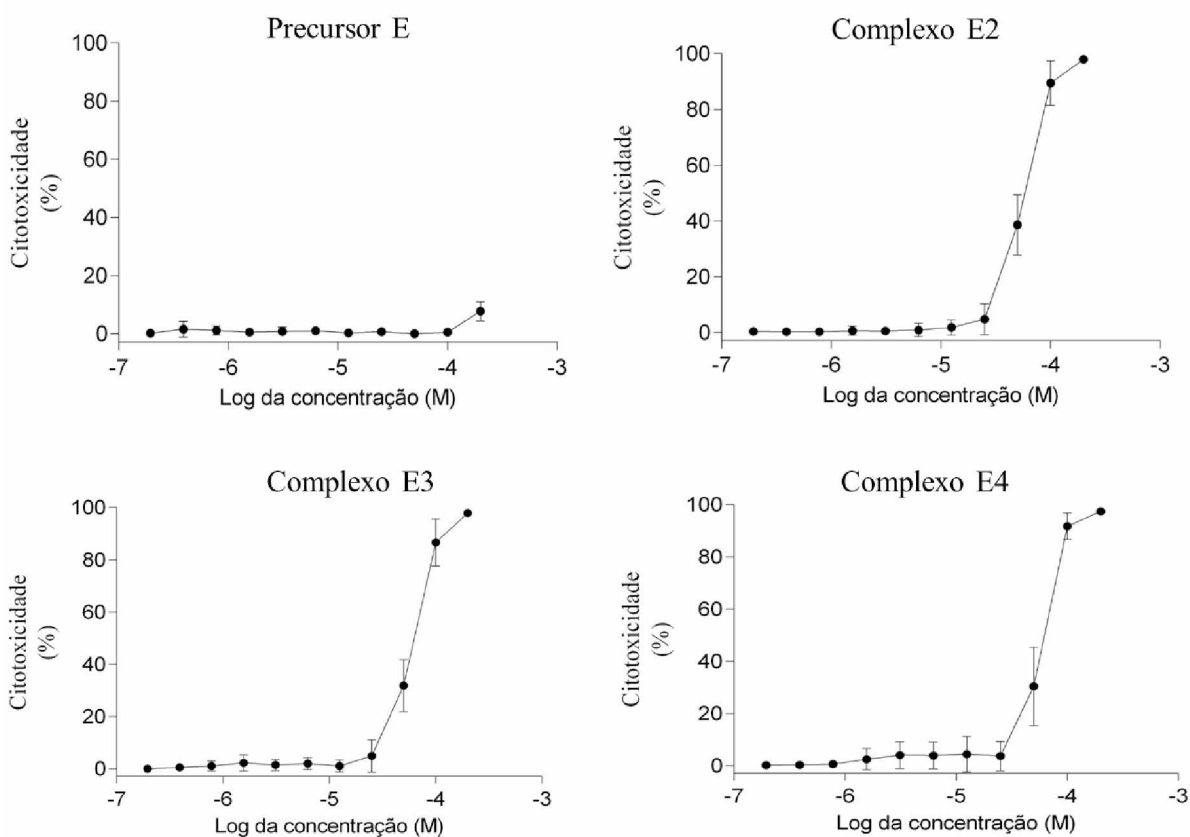


Figura 6- Curvas dose-efeito de novos complexos de rutênio (II) em formas promastigota de *L. (V.) braziliensis*, obtidas através do ensaio de MTT. Parasitos foram tratados com os novos complexos por 72h. Os gráficos mostram o efeito citotóxico dos complexos em função da concentração dos diferentes complexos, no qual onde -3,69 log representa a maior concentração (200µM) e -6,70 log representa (0,19 µM). A citotoxicidade está mostrada em porcentagem em relação a parasitos controle, cultivados por 72h na ausência de complexo, sendo considerado, portanto, como 100% de viabilidade.

Complexo de rutênio (II)	<i>Leishmania (V.) braziliensis</i>
	IC <sub>50</sub> (µM) (Intervalo de confiança de 95%)
E (precursor)	>200
E2	61,12 (58,11µM -64,28µM)
E3	56,2 (53,82µM-58,77µM)
E4	59,1 (55,42 µM-63,22µM)

Tabela 2-Tabela que indica a citotoxicidade dos complexos de rutênio (II) em valores de IC<sub>50</sub> analisados através do software GraphPad Prism 6.

## 6. Discussão

O estudo avaliou a eficiência de 3 novos complexos de rutênio (II) perante as células promastigota de *Leishmania (V.) braziliensis*. As análises foram feitas com o complexo E (precursor) que não apresentou resposta citotóxica contra os parasitos. Importaneamente, os novos complexos derivados do precursor E exibiram respostas significativas em relação à toxicidade celular dos parasitos, sugerindo que as alterações químicas realizadas nos 3 novos complexos foram responsáveis pela citotoxicidade.

O complexo E3 destacou-se por exibir o menor valor de IC<sub>50</sub> em relação aos demais complexos. Entretanto, valores muito próximos ao do complexo E3 também foram observados para os complexos E2 e E4. Os ligantes dos 3 complexos são bastante semelhantes, sendo as modificações mais evidentes a presença de enxofre (S), bromo (Br) e flúor (F) nas estruturas cíclicas dos ligantes de E2, E3 e E4, respectivamente. Tendo em vista os valores de IC<sub>50</sub> muito próximos, pode-se sugerir que a toxicidade promovida por tais moléculas esteja relacionada com as porções estruturais que são comuns para os 3



diferentes ligantes. Ainda, dados da literatura mostram que estes mesmos complexos também são efetivos contra promastigota da espécie *Leishmania (L.) amazonensis* (MACÊDO, 2018). No caso, os valores de IC<sub>50</sub> foram de 4,8 µM, 3,9 µM e 24,7 µM para os complexos E2, E3 e E4, respectivamente. Assim, tais novos complexos, apesar de apresentarem efeito em *L. (V.) braziliensis*, mostraram-se mais efetivos contra *L. (L.) amazonensis*. Apesar disso, vale ressaltar que *L. (V.) braziliensis* causa a forma mucocutânea e é de difícil cura, portanto encontrar um tratamento é de extrema importância.

De acordo com Macêdo, a atividade biológica sobre a *Leishmania (L.) amazonensis* acontece pela presença de ligantes fosfínicos, moléculas que provocam uma maior lipofilidade e auxilia, portanto, na interação entre os complexos e a célula promastigota (MACÊDO, 2018).

Outro estudo, utilizou os complexos de rutênio com outras cadeias ligantes em células promastigota de *Leishmania (V.) braziliensis*. Os resultados obtidos mostraram valores de IC<sub>50</sub> bem baixos (Complexo 1, IC<sub>50</sub> de 9,09 µM; Complexo 2: IC<sub>50</sub> de 3,28 µM; Complexo 3, IC<sub>50</sub> de 0,86 µM), sendo que tais valores foram observados após 24h de incubação com os complexos (COSTA et al., 2016).

Em relação as drogas de escolha como tratamento, elas apresentaram IC<sub>50</sub> de 3,9 µM para Pentamidina (FARIA et al., 2013); 15,6 µM para Anfotericina B (PALADI et al., 2012) e 25,6 µM para Glucantime (RAMIREZ-MACIAS et al., 2012) e. Todos os estudos foram realizados *in vitro* com células promastigota de *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (L.) amazonensis*; e *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) infantum*, respectivamente.

Dessa forma, fica evidente a necessidade de mais experimentos, testando outras espécies do parasito *Leishmania*, bem como realizar teste de toxicidade em células normais do hospedeiro com o intuito de melhor entender o efeito desses complexos no parasito, assim como em células hospedeiras. Como também realizar maiores modificações estruturais com o intuito de reduzir a toxicidade para o macrófago e aumentar potência contra o parasito.

## 7. Conclusão

O presente estudo demonstrou que 3 novos complexos de rutênio (II) (E2, E3 e E4) apresentam uma significativa citotoxicidade em promastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Tal toxicidade sobre as células promastigota de *Leishmania (V.) braziliensis* foi detectada após 72 horas de incubação. Por fim, é importante ressaltar que novos ensaios para a averiguação da toxicidade em formas promastigota e amastigota de diferentes espécies são necessários, bem como ensaios em macrófagos de mamíferos para que se obtenha mais informações acerca do índice de seletividade desses complexos e seu potencial uso para tratamento na leishmaniose.

## 8. Referencial Bibliográfico

- AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, mar. 2016.
- ALESSIO, E. et al. Ruthenium anticancer drugs. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 86, n. 2, p. 62-69, 2001.
- ALLARDYCE, C.S.; DYSON, P.J. Ruthenium in medicine: current clinical uses and prospects. **Platinum Metals Rev.** v. 45, p. 62-69, 2001.
- ALVAR, Jorge et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS neglected tropical diseases**. 7 (5): e35671. 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>.
- AMATO, V. S. et al. Treatment of Mucosal Leishmaniasis in Latin America: Systematic Review. **Am J Trop Med Hyg.** 2007 Aug;77(2):266-74.
- ANTONARAKIS, E. S.; EMADI, A. Ruthenium- based chemotherapeutics: are they for prime time? **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2010.
- ASHARANI, P. V. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. **ACS nano**, v. 3, n. 2, p. 279-290, 2008.

BARBOSA, M. I.F et al. Antiparasitic activities of novel ruthenium/ lapachol complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, V. 136, p. 33-39, 2014.

BARI, A. U; RAHMAN, S. B. Cutaneous leishmaniasis: an overview of parasitology and host-parasite-vector inter relationship, **Journal of Pakistan Association of Dermatologists**, v.18, p.42 – 48, 2008.

BATES PA, ROGERS ME. New Insights into the Developmental Biology and Transmission Mechanisms of *Leishmania*. **Curr Mol Med**. 2004; 4(6):601- 609.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. atual. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 7. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. atual. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade** / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*-HIV** / Ministério da

Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica – Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. Constituição (1988). Constituição Federal nº 5, de 22 de setembro de 1988. 90. **Direitos Sociais**. Brasília, MINAS GERAIS, 18 fev. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília : Ministério da Saúde, 2017.

BRELAZ, M. C. A. et al. Antigenic fractions of *Leishmania (Viannia) braziliensis*: the immune response characterization of patients at the initial phase of disease. **Parasite Immunology**, v. 34, n. 4, p. 236–239, abr. 2012.

CABALLERO, A. B; SALAS, J. M; SANCHEZ-MORENO, M. Metal-based therapeutics for Leishmaniasis, **Science, Technology and Medicine open Access Publisher (INTECH)**, p.465 – 493, 2015.

CLARKE, M. J. Ruthenium metallopharmaceuticals. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 236, n. 1-2, p. 209-233, 2003.

COPELAND, K N.; ARONSON N E. Leishmaniose: atualizações de tratamento e revisão de diretrizes de prática clínica. **Current Opinion in Infectious Diseases** .28(5):426-37, 2015.

COSTA, M.S. **Potencial anti-*Leishmania* de novos complexos de rutênio (II): Efeito na interação parasito-hospedeiro**. 2016. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, 2016.

COSTA, M.S. et al. Anti-*Leishmania* activity of new ruthenium (II) complexes: Effect on parasitehost interaction. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 2017.

COSTA, M. S. et al. Increased ROS generation causes apoptosis-like death: Mechanistic insights into the anti-*Leishmania* activity of a potent ruthenium (II) complex. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 2019.

COX, F. E. **A textbook of parasitology**. Blackwell Science Ltd, 2<sup>a</sup> ed., 1993.

FARIA, J. V et al. Synthesis and activity of novel tetrazole compounds and their pyrazole-4- carbonitrile precursors against *Leishmania spp.* **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 23, p. 6310-6312, 2013.

FARRELL, N. P; WILLIAMSON, J, MCLAREN, D. J. M. Trypanocidal and antitumour activity of platinum-metal and platinum-metal-drug dual-function complexes, **Biochemical Pharmacology**, v.33, p. 961-971, 1984.

FARRELL, N. P. Transition Metal Complexes as Drugs and Chemotherapeutic Agents. In: R. Ugo, B. R. James (eds.) *Catalysis by Metal Complexes*, **Dordrecht: Kluwer Academic Publishers**, v.11, p. 222-242, 1989.

FEITOSA, M.M. et al. Aspectos clínicos de cães com leishmanioses no Município de Araçatuba – São Paulo, Brasil. **Clínica Médica**, 28: 36-44p, 2000.

FURTADO, T.; DO VALE, S E C. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **Anais brasileiros de dermatologia**, 2005.

FURUSAWA, G. P.; BORGES, M. F. Colaboração para o conhecimento histórico da leishmaniose tegumentar americana no Brasil: Possíveis casos entre escravos na vila de Vassouras-RJ, nos anos 1820 a 1880. **Rev Patol Trop**, v. 43, n. 1, p. 7–25, 2014.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 8, n. 4, p. 419–433, 2010.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International Journal of Parasitology**, v.35, n.11-12, p. 1169- 1180, 2005.

GUERRERO, E. T. et al. Leishmaniasis: a review. **F1000 Research**, v. 6, n. 75, 2017.

HANDLER, MZ. et al. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 73, n. 6, p. 911-26–8, dez. 2015.

HANDMAN, E; BULLEN, D.V. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends Parasitol.** 18(8):332- 334, 2002.

HIDE, M. et al. Understanding Human Leishmaniasis: The need for an integrated approach in encyclopedia of infectious diseases book of microbiology, **Infectious Diseases**, 2006.

HIDE, M. et al. **Understanding human leishmaniasis: The need for an integrated approach in encyclopedia of infectious diseases book of microbiology**. John Wiley and Sons, p. 87-107, 2007.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends Parasitol**, v. 22, n. (9): p. 439- 445, 2006.

KOMEDA, S; CASINI, A. Next-Generation Anticancer Metallodrugs, **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 3, p. 219 - 235, 2012.

KOSTOVA, I. Ruthenium complexes anticâncer agentes. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 9, p. 1085-1107, 2006.

LAINSON, R; SHAW, JJ. New world Leishmaniasis - The Neotropical *Leishmania* species. In: **Topley & Wilson**. Microbiology and Microbial Infections (9 a ed). London: Ed. Feg Cox; 1988.

LAINSON R. On *Leishmania enriettii* and other enigmatic *Leishmania* species of the neotropics. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v.92, p.337-387, 1997.

LAINSON, R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia, **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.1, n.2, p. 13 – 32, 2010.

LASKAY, T.et al. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. **Immunobiology**. V. 213, n. (3-4): p. 183- 191, 2008.

LI, J.; SONG, L. Applicability of the MTT assay for measuring viability of cyanobacteria and algae, specifically for *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria). **Phycologia**, v. 46, p. 593–599, 2007.

LIMA, E. B. De et al. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 2, p. 111–124, 2007.

LUKES J. et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.104, n.22, p. 9375 – 9380, 2007.

MACÊDO, Roberta Rocha. **Síntese, caracterização e estudo das estruturas eletrônicas de complexos à base de rutênio (II) contendo  $\beta$ -dicetonas: avaliação da atividade leishmanicida**. 2018. Dissertação (Pós-Graduação em Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, 2018.

MARCONATO, Silvia. Leishmaniose: Tratamento e Prevenção. **Núcleo Educacional Científico**. São Paulo: Acessória Médica Fleury, 2007.

MAURÍCIO, I. L.; STOTHARD, J. R; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*, **Parasitol Today**, v.16, n.5, p.188 – 189, 2000.

MCGUIRE, B.S.; SATOSKAR, R. C.; Pathophysiology of visceral leishmaniasis – some recente concepts. **Indian Jour. Of Med. Resea.**, v. 123, p. 267-274, 2006.

MEDICI, S. et al. Noble metals in medicine: Latest advences. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 284, n. 0, p. 329-350, 2015.

MESQUITA, J. T. **Mecanismo de ação de fármacos sintéticos e associações terapêuticas em *Leishmania (L.) infantum***. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2013.

MJOS, K.; ORVIG, C. Metallodrugs in Medicinal Inorganic Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 114, n.8, p. 4540-4563, 2014.

NAGLE, A. S. et al. Recent developments in drug discovery for Leishmaniasis and human African Trypanosomiasis. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 22, p. 11305-11347, 2014.

NAVARRO, M, GABBIANI, C, MESSORI, L, GAMBINO, D. Metal-based drugs for malaria, trypanosomiasis and leishmaniasis: recent achievements and perspectives, **Drug Discovery Today**, v.15, p. 1070 – 1078, 2010.

NEGRÃO, Glauco Nonose. **Leishmaniose tegumentar americana: aspectos geográficos intervenientes na ocorrência da enfermidade no município de Maringá**, Paraná (dissertação de mestrado). Maringá: Universidade Estadual de Maringá, Programa de pós-graduação em Geografia, 2009.

NEGRÃO, N.G; FERREIRA, C M ME. Considerações sobre a leishmaniose tegumentar americana e sua expansão no território brasileiro. Considerações sobre a Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista Percursos**. Maringá, v. 6, n. 1, p.147- 168, 2014.

NEVES, L. O. et al. Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 6, p. 1092–1101, dez. 2011.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 12 ed. – São Paulo: Editora Atheneu, 2011.

OLIVEIRA, L. F. et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Tropica**, v.118, n.2, p.87–96,2011.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Report on global surveillance of epidemic-prone infections diseases**. Leishmaniasis and Leishmaniasis/HIV co-infection, 2004.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Technical report series**. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the who Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. World Health Organization technical report series, v. 949, n. March, p. 202, 2010.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Leishmaniasis**: strengthening cross-border collaboration for control in central Asian and middle eastern countries of the who European and Eastern Mediterranean Regions, 2014.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases**. p. 191, 2015.

PALADI, C.S. et al. *In Vitro* and *In Vivo* Activity of a Palladacycle 108 Complex on *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. (5): p. 1626, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001626>.

PEREIRA JCM. et al. Antileishmanial activity of ruthenium (II) tetraammine nitrosyl complexes. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 45: p. 4180-4187, 2010.

PEREIRA, F.C et al. Cis-[RuCl(BzCN)(N-N)(P-P)]PF<sub>6</sub> complexes: Synthesis and *in vitro* antitumor activity: (BzCN=benzonitrile; N-N=2,2'-bipyridine; 1,10-phenanthroline; P-P=1,4-bis(diphenylphosphino) butane, 1,2-bis(diphenylphosphino)ethane, or 1,1'-



(diphenylphosphino)ferrocene), **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.149, p.91 – 101, 2015.

RAMIREZ-MACIAS, I. et al. In vitro evaluation of new terpenoid derivatives against *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis*, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 370 – 376, 2012.

ROBERTS, LS; JANOVY, JJ. **Foundations of parasitology**. In: New York: McGraw-Hill, cap. Kinetoplastida: Trypanosomes and their kin, p 55-81, 2000.

ROBERTS, M. T et al. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment, **British Medical Bulletin**, v.17, p. 115 – 130, 2006.

ROGERO, S.O. et al. Citotoxicidade de ligas metálicas utilizadas como biomateriais. **Toxicology in Vitro**, v. 14, n. 6, p. 497-504, 2000.

ROSENBERG, B; VANCAMP, L; KRIGAS T. Inhibition of Cell Division in *Escherichia Coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. **Nature**; v. **205**: p. 698-699, 1965.

SANTOS, D. O. et al. Leishmaniasis treatment—a challenge that remains: a review. **Parasitology Research**, v. 103, n. 1, p. 1-10, 2008.

SAVOIA, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **Journal of Infection in 108 Developing Countries**, v. 9, n. 6, p. 588–596, 4 jul. 2015.

SILVA, D. G. **Padronização do cultivo de amastigotas axênicos e intracelulares de *Leishmania spp.* e análise da atividade leishmanicida de chalconas**. 2008. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 2008.

SILVA, P.P.; GUERRA, W. Rutênio. **Química Nova Escola**, v.34, n.2, p. 99-100, 2012.

SILVA, S. S. et al. Leishmanicidal activity of brazilian propolis hydroalcoholic extract in *Leishmania amazonensis*. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 36, n. 2, p. 25-34, 2015.

SILVEIRA, FT. et al. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: **Leão RNQ**. Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico. Belém: Editora CEJUP; 1997.

SHAW, J. J. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 471–478, 1994.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 16, n. 2, p. 237–52, fev. 2015.

VARGAS, G. A. et al. Clinical picture of cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania Mexicana* in the Yucatan Peninsula. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p.163-167, 2001.

VIANNA, G. Sobre uma nova especie de *Leishmania* (Nota Preliminar). **Brasil-Médico**; v.25, p.411, 1911.

VIEIRA, E. L. et al. Immunoregulatory profile of monocytes from cutaneous leishmaniasis patients and association with lesion size, **Parasite Immunol**, v. 35, n.2, P.65-72, 2013.

WOZNIAK, K.; et al. Cisplatin- evoked DNA fragmentation in normal and cancer cells and its modulation by free radical scavengers and the tyrosine kinase inhibitor STI57. **Chemico-Biological Interactions**, v. 147, n.3, p. 309- 318, 2004.

WRIGHT, J. H. Protozoa in a case of tropical ulcer ("Delhi sore"), **Journal of International Medical Research**, v.10, n.3, p.472 – 482, 1903.

YOUNG, D.G; DUCAN, N.A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomya* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Mem Am Entomol Inst**. V.54: p. 1-881, 1994.